

УДК 615.074: 615.213

## **РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЭЖХ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАЛЬПРОАТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

**А.С. Малыгин, Н.С. Попов, М.А. Демидова, М.А. Горшкова**

Тверской государственный медицинский университет, Тверь

В настоящем исследовании разработана методика высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) для определения вальпроатов в плазме крови. Хроматографию выполняли с использованием аналитической колонки Phenomenex synergi Fusion 4 мкм-С18 2×50 мм. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанола и воды деионизированной в соотношении 90:10 с добавлением 0,1% аммония ацетата в изократическом режиме, скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин. Масс-спектрометрическую идентификацию вальпроевой кислоты осуществляли при отрицательной поляризации в режиме регистрации множественных ионов (МІМ) по значению  $m/z$  143,1. Предел обнаружения вальпроевой кислоты в плазме крови был равен 0,5 мкг/мл. Диапазон применения методики составил от 1 мкг/мл до 200 мкг/мл. Метод был валидирован по параметрам селективности, точности, прецизионности, линейности, кросс-переносу, стабильности.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ-МС/МС, хроматография, масс-спектрометрия, вальпроевая кислота, вальпроаты, противоэпилептические средства.

**Введение.** Вальпроаты относятся к противоэпилептическим средствам основного ряда, их широко используют в лечении эпилепсии различных форм (большие и малые приступы, миоклоническая, тонико-клоническая и биполярная формы) и других заболеваний ЦНС, сопровождающихся эпилептическим синдромом (Perucca, 2012; Фрейдкова и др., 2015). Препараты вальпроевой кислоты применяют как перорально, так и внутривенно, в том числе в виде натриевых, кальциевых и магниевых солей (Кудряшова и др., 2016). Терапевтическая концентрация вальпроевой кислоты в плазме крови составляет 50-100 мкг/мл. Существенными недостатками вальпроатов являются нелинейность фармакокинетики, развитие токсических реакций за счет кумуляции даже при использовании в среднетерапевтических дозах у пациентов с генетически замедленным метаболизмом (Sztajnkrzyser, 2002; Шнайдер, Дмитренко, 2016), что

обуславливает необходимость проведения лекарственного мониторинга (Леонова и др., 2017). Терапевтический лекарственный мониторинг является реальным инструментом для персонализированной фармакотерапии. В настоящее время эталонным методом для качественной и количественной оценки аналита в плазме крови при проведении лекарственного мониторинга является высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) (Попов и др., 2017).

Цель – разработка и валидация методики ВЭЖХ-МС/МС определения вальпроевой кислоты в плазме крови для лекарственного мониторинга вальпроатов.

**Методика.** Определение вальпроатов в плазме крови осуществляли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, ФРГ). В качестве детектора использовали тройной квадрупольный масс-спектрометр AB Sciex QTrap 3200 MD (AB Sciex, Сингапур) с электрораспылительным источником ионов (Turbo V с зондом TurboIonSpray). Калибровку масс-спектрометра проводили с помощью тестового раствора резерпина в концентрации  $6,1 \times 10^{-2}$  мг/л.

Валидацию разработанной методики ВЭЖХ-масс-спектрометрического определения вальпроатов в плазме крови осуществляли в соответствии с отечественными и международными рекомендациями по валидации биоаналитических методов (Guidance..., 2001; Береговых, 2008). Оценивали селективность, правильность, линейность, прецизионность разработанного метода. Нижний предел количественного определения и предел обнаружения вальпроевой кислоты определяли по минимальной концентрации исследуемого вещества, для которой соотношение сигнал/шум были соответственно более 10:1 и 3:1.

Учитывая тот факт, что используемые в качестве лекарственных препаратов соли (натрия, кальция и магния) вальпроевой кислоты диссоциируют с образованием вальпроат-иона калибровку осуществляли с использованием растворов вальпроевой кислоты.

Стандартные растворы вальпроевой кислоты различной концентрации получали последовательным разведением из исходного раствора исследуемого соединения 1 мг/мл (stock solution), используя в качестве растворителя 90% раствор метанола в воде деионизированной с добавлением 0,1% аммония ацетата. Стабильность стандартных растворов оценивали при их хранении в течение 14 дней при температуре от 2 до 8°C.

Для доказательства селективности разработанного метода использовали образцы плазмы крови, не содержащие аналит (плазма

крови здоровых доноров). Для оценки переноса пробы осуществляли последовательный анализ образца, содержащего вальпроевую кислоту в концентрации 100 мкг/мл и образца, не содержащего аналит.

При разработке калибровочного решения использовали 6 концентраций вальпроевой кислоты (1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл) с 3-х кратным повторением исследования для каждой концентрации. Оценивали наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации исследуемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики (диапазона определения). С этой целью результаты исследования обрабатывали статистически методом наименьших квадратов. Линейной считали зависимость при значении коэффициента корреляции более 0,99. Аналитическую область методики устанавливали по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели.

Для оценки прецизионности и правильности методики проводили анализ 4 образцов плазмы крови с концентрацией вальпроевой кислоты 1 мкг/мл (нижний предел количественного определения), 10 мкг/мл (низкая концентрация), 50 мкг/мл (средняя концентрация), 200 мкг/мл (высокая концентрация). Каждый раствор хроматографировали по 5 раз. Исследования проводили как в один день (intra-day), так и через день (inter-day). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности ( $\epsilon$ , %). Пределом приемлемости считали значение относительного стандартного отклонения для минимальной концентрации не более 20%, для остальных – не более 15%.

Для изучения влияния компонентов биологической матрицы при валидации разработанной методики оценивали матричный эффект. С этой целью анализировали образцы плазмы крови 6 доноров, добавляя к ним вальпроевую кислоту до получения концентраций 10 мкг/мл, 100 мкг/мл и 200 мкг/мл.

Степень извлечения вальпроевой кислоты из плазмы крови (%) оценивали по соотношению площадей пиков, полученных при анализе образцов плазмы крови, к которым была добавлена вальпроевая кислота в трех различных концентрациях и модельных растворов вальпроевой кислоты в метаноле аналогичных концентраций.

Учитывая тот факт, что при проведении хроматографического исследования для автоматического ввода большого числа проб используют автосамплеры, в настоящем исследовании оценивали стабильность исследуемых образцов после 24 часов их нахождения при температуре 15<sup>0</sup>С. Стабильность в составе биологической матрицы подтверждали, проводя исследования в течение 3-х циклов заморозки-

разморозки проб. В качестве критерия приемлемости считали изменение площади пика не более 10%.

Идентификацию вальпроевой кислоты осуществляли масс-спектрометрически на основании регистрации множественных ионов при отрицательной ионизации.

В качестве программного обеспечения использовали Analyst MD 1.6.3.Software (AB Sciex).

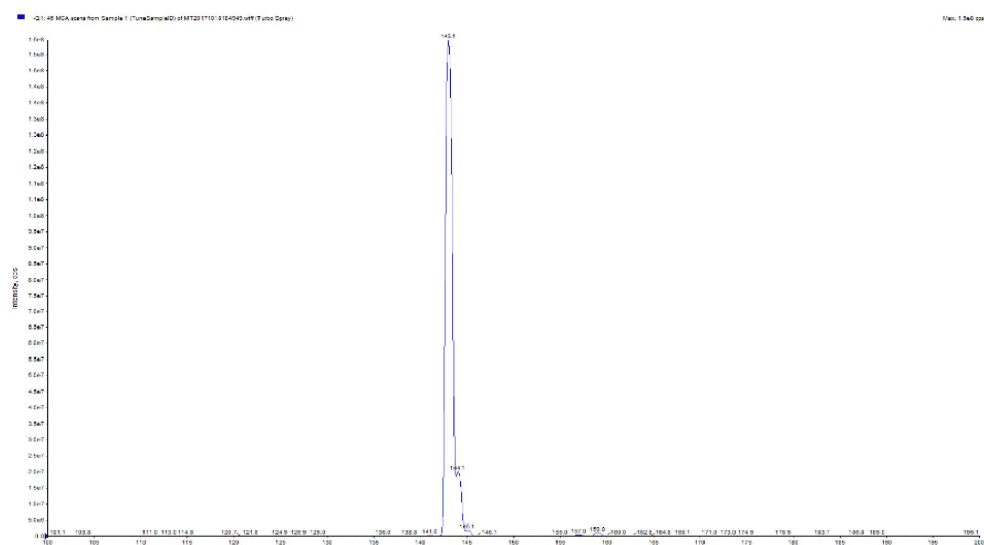
**Результаты и обсуждение.** Для пробоподготовки был выбран метод осаждения белков плазмы крови метанолом. Для этого к 200 мкл исследуемого образца плазмы крови добавляли 50 мкл стандартного раствора вальпроевой кислоты в метаноле и 550 мкл метанола с 0,1% аммония ацетата. Для приготовления бланка к 200 мкл плазмы крови добавляли 600 мкл метанола с 0,1% аммония ацетата. Пробы встряхивали на вортекс-шейкере в течение 30 секунд, термостатировали 20 минут при температуре 37 °С, далее центрифугировали в течение 10 минут при 13000 об/мин, после чего надосадочную жидкость переносили в вials для хроматографа.

Для анализа образцов плазмы крови были подобраны следующие условия хроматографирования: неподвижная фаза – аналитическая колонка Phenomenex synergi Fusion 4 мкм-С18 2×50 мм при температуре 50 °С; подвижная фаза – смесь метанола и воды деионизированной в соотношении 90:10 с добавлением 0,1% аммония ацетата; скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин; объем вводимой пробы - 10 мкл; общее время изократического элюирования – 5 минут.

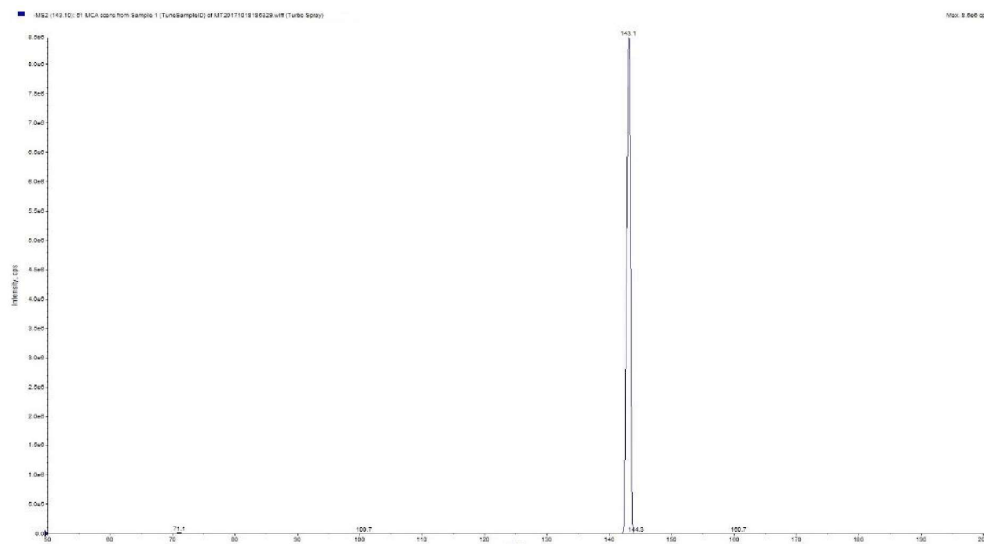
Детекцию вальпроевой кислоты осуществляли масс-спектрометрически в режиме регистрации множественных ионов (МІМ), используя электрораспылительный источник ионов (Turbo V с зондом TurboIonSpray). Для получения устойчивой масс-спектрограммы были подобраны следующие условия детектирования: отрицательная поляризация, напряжение электроспрея -4500,0 В, потенциал декластеризации -45,0 В; при давлении газа завесы 20,0 psi и газа распыления 40,0 psi, потенциал ввода -9,0 В.

Выбор режима МІМ для идентификации вальпроевой кислоты был связан с тем, что масс-спектры аналита первого (рис.1) и второго порядков (рис. 2) являлись одинаковыми, так как вальпроевая кислота не фрагментируется на ионы-продукты на третьем аналитическом квадруполе Q3 из-за особенностей своего химического строения. В связи с этим использование мониторинга множественных реакций (MRM) для идентификации аналита при осуществлении МС/МС-анализа являлось не целесообразным.





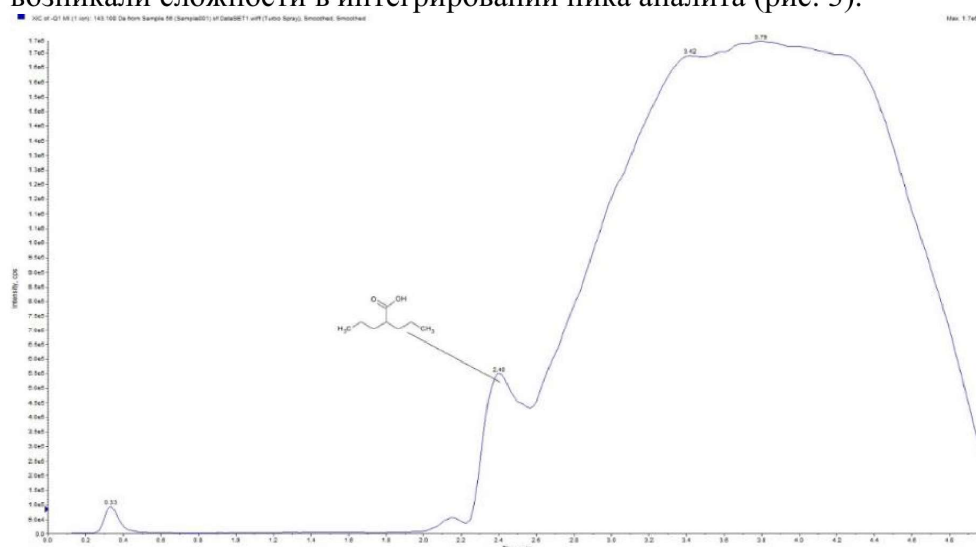
Р и с . 1 . Масс-спектр депротонированной вальпроевой кислоты  $[M-H]^-$  (в режиме сканирования отрицательно заряженных ионов).



Р и с . 2 . Масс-спектр вальпроевой кислоты 2 порядка (в режиме сканирования отрицательно заряженных ионов, для иона-предшественника  $m/z$  143,1  $[M-H]^-$ ).

Недостатком МІМ-метода является высокий уровень фонового шума на хроматограмме из-за отсутствия селективности. Это возникает из-за наличия в сложной матрице значительного количества компонентов, приводящих к возникновению помех. Высокий уровень шума значительно увеличивает предел количественного определения, что также сказывается на концентрациях стандартных растворов, которые являются относительно высокими. Повышение селективности

анализа требует более продолжительного хроматографирования с выбором такого состава подвижной фазы, при котором уровень базовой линии остается минимальным. Использование в качестве подвижной фазы смеси метанола и воды деионизированной в соотношении 90:10 с добавлением 0,1% аммония ацетата обеспечило оптимальный уровень базовой линии. Продолжительность хроматографирования в изократическом режиме составило 5 минут. Выбор изократического режима был связан с тем, что при градиентном режиме из-за выраженного скачка базовой линии при смене состава подвижной фазы, возникали сложности в интегрировании пика аналита (рис. 3).



Р и с . 3 . Хроматограмма вальпроевой кислоты  $[M-H]^+$  в градиентном режиме (выход вальпроевой кислоты наблюдается в момент увеличения концентрации ацетонитрила в подвижной фазе).

Предел обнаружения вальпроевой кислоты при масс-детектировании в режиме МІМ составил 0,5 мкг/мл (соотношение сигнал/шум – 4,3:1), а нижний предел количественного определения – 1 мкг/мл (соотношение сигнал/шум – 11,4:1). Хроматограмма вальпроевой кислоты с концентрацией на уровне нижнего предела количественного определения представлена на рис. 4.

Для доказательства селективности разработанного метода провели анализ бланка (образцов плазмы крови, не содержащих аналит). Ложноположительные результаты при отсутствии исследуемого вещества в пробе отсутствовали. На хроматограммах бланка пиков, соответствующих по времени удерживания вальпроевой кислоты, обнаружено не было.

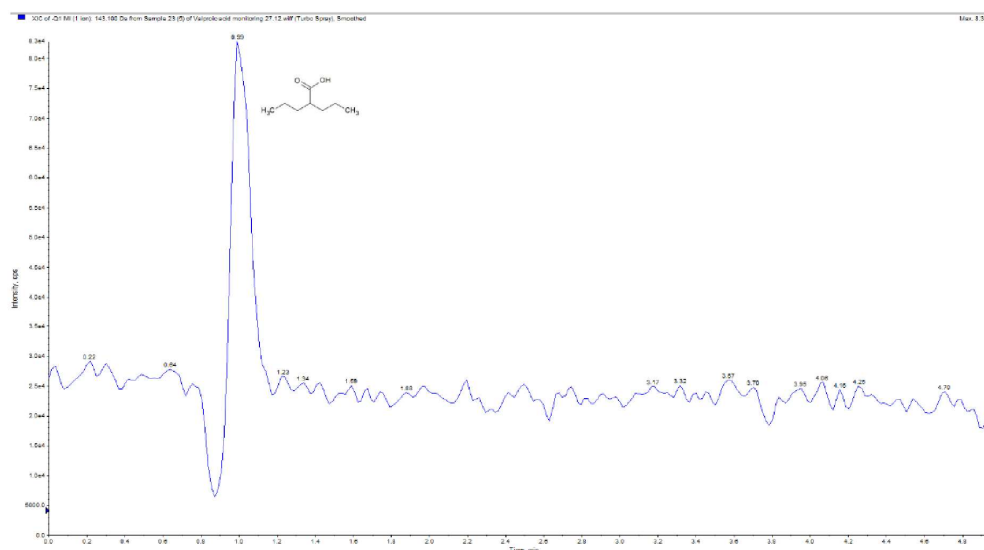


Рис. 4. Хроматограмма плазмы крови с содержанием вальпроевой кислоты на уровне нижнего предела количественного определения (1 мкг/мл).

При последовательном анализе образца плазмы крови с концентрацией вальпроевой кислоты 100 мкг/мл и бланка, переноса пробы отмечено не было (рис. 5).

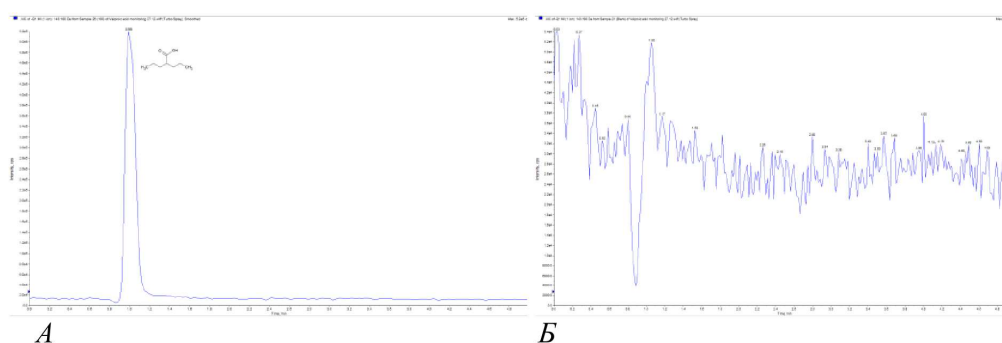
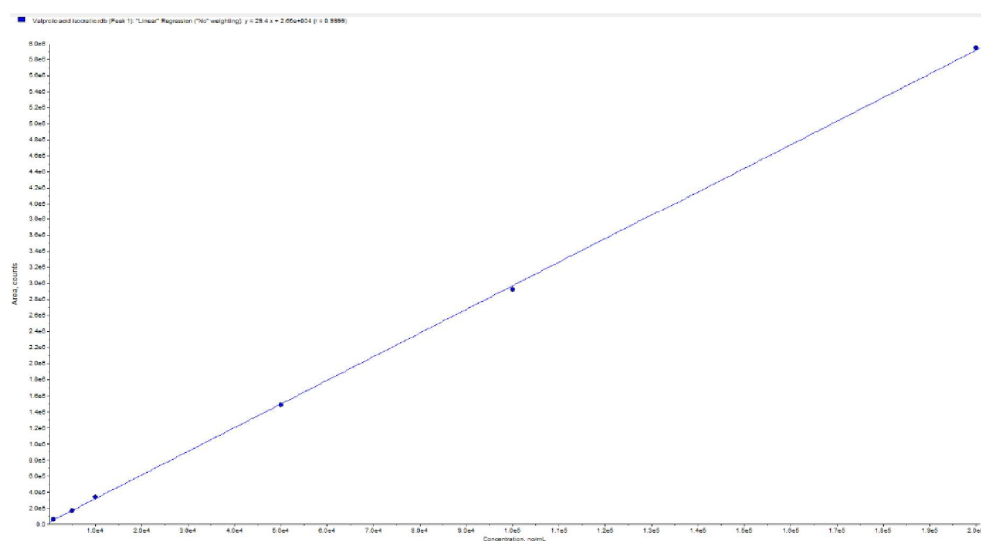


Рис. 5. Хроматограмма плазмы крови с содержанием вальпроевой кислоты 100 мкг/мл (А) и бланка (плазмы крови, не содержащей аналит) (Б).

При построении калибровочного графика использовали образцы плазмы крови с концентрацией вальпроевой кислоты от 1 мкг/мл (нижний предел количественного определения) до 200 мкг/мл (рис. 6).

Статистическая обработка результатов исследования методом наименьших квадратов показала, что в данном диапазоне отмечалась линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации исследуемого вещества в анализируемой пробе. Эта зависимость описывалась следующим уравнением:  $y=29,4x+2650$ , где  $x$  – концентрация вальпроевой кислоты мкг/мл,  $y$  – величина

аналитического сигнала. Значение коэффициента корреляции составило  $r^2=0,9999$ .



Р и с . 6 . Калибровочный график для количественного определения вальпроевой кислоты в плазме крови.

На основании анализа 6 образцов плазмы крови, содержащих вальпроевую кислоту в концентрациях 10 мкг/мл, 100 мкг/мл и 200 мкг/мл было показано, что величина матричного эффекта не превышала 15%.

Степень извлечения вальпроевой кислоты из плазмы крови для концентраций 10,0 мкг/мл, 100 мкг/мл и 2000 мкг/мл составляла 93,6%, 96,8% и 97,9% соответственно, RSD – 7,4%, 5,1% и 4,8% соответственно.

Было выявлено, что стандартные растворы при их хранении в течение 14 дней при температуре от 2 до 8 °С и образцы плазмы крови, содержащие аналит (при их хранении в течение 24 и 48 часов при температуре 15°С) сохраняют свою стабильность. Одновременно было отмечено, что образцы плазмы крови (с концентрацией вальпроевой кислоты 1 мкг/мл и 200 мкг/мл) выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

Для оценки правильности и прецизионности разработанной методики анализировали образцы плазмы крови с содержанием вальпроевой кислоты на уровнях нижнего предела количественного определения (1 мкг/мл), низких (10 мкг/мл), средних (50 мкг/мл) и высоких (200 мкг/мл) концентраций. Исследования проводили в течение одного дня (intra-day) и на следующий день (inter-day). Для

каждой концентрации хроматографию проводили 5 раз. Результаты исследования представлены в таблице.

Т а б л и ц а

Оценка правильности и прецизионности методики количественного определения вальпроевой кислоты (intra-day и inter-day)

Аналит, нг/мл	intra-day			inter-day			Критерий приемлемости
	$\bar{x} \pm SD$	RSD, %	$\varepsilon$ , %	$\bar{x} \pm SD$	RSD, %	$\varepsilon$ , %	
1	0,97 $\pm 0,05$	4,99	-2,45	0,98 $\pm 0,03$	3,48	-1,64	<20%
10	10,01 $\pm 0,35$	3,51	0,17	9,89 $\pm 0,21$	2,16	-1,08	<15%
50	104,03 $\pm 2,06$	7,82	1,98	101,52 $\pm 1,50$	1,47	1,52	<15%
200	994,10 $\pm 3,17$	0,31	-0,59	993,30 $\pm 3,85$	0,39	-1,67	<15%

**Заключение.** Анализ полученных данных показал, что для всех концентраций вальпроевой кислоты значения относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности ( $\varepsilon$ , %) соответствовали валидационным критериям (не более 20 % для минимальной концентрации, не более 15 % – для остальных концентраций).

Разработанная методика была апробирована для количественного определения вальпроевой кислоты в плазме крови пациентов с эпилепсией, получавших препараты вальпроатов. Показано, что аналитический диапазон методики позволяет применять ее для лекарственного мониторинга. У всех обследованных пациентов содержание вальпроевой кислоты было в пределах данного диапазона. Методика является селективной, точной, прецизионной и линейной, по всем параметрам соответствует требованиям по валидации биоаналитических методов. Отличительной особенностью разработанной методики является использование режима MIM (наиболее часто при масс-спектрометрическом определении вальпроевой кислоты используют MRM-метод (Zhao et al., 2016)) и изократического режима. Внедрение методики количественного определения вальпроатов в плазме крови в работу клинических лабораторий позволит обеспечить индивидуальный подход к лечению пациентов с эпилепсией, тем самым повысив эффективность фармакотерапии.

### Список литературы

- Береговых В.В. 2008. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. М.: Литтерра. С. 18-65.
- Кудряшова М.Н., Малыгин А.С., Максименко С.А. 2016. Анализ стоимости лечения основными противоэпилептическими препаратами // Молодежь,

- наука, медицина: материалы 62-й Всеросс. межв. студ. научн. Конф. С. 248-250.
- Леонова, М.В., Ивжиц М.А., Тищенко И.Ф. 2017. Терапевтический лекарственный мониторинг антиконвульсантов у детей в реальной практике // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. Т.9. №. 1 С. 26-34.
- Попов Н.С., Малыгин А.С., Демидова М.А. 2017. Разработка ВЭЖХ-МС/МС-метода для идентификации и количественного определения нового производного тиадиазола // Современные проблемы науки и образования. № 5. URL: [www.science-education.ru/ru/article/view?id=26988](http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26988).
- Фрейдкова Н.В., Пылаева О.В., Мухин К.Ю. 2015. Вальпарин ХР в лечении эпилепсии (обзор литературы и описание клинических случаев) // Русский журнал детской неврологии. Т. 10. № 3. С. 37-42.
- Шнайдер Н.А., Дмитренко Д.В. 2016. Хроническая интоксикация вальпроевой кислотой в эпилептологии: диагностика и лечение // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. Вып. 8(2). С. 94-99.
- Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Government Printing Office, Washington, DC, 2001.
- Perucca E. 2012. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience // CNS Drugs. № 16(10). P. 695-714.
- Sztajnkrzycki M.D. 2002. Valproic acid toxicity: overview and // J Toxicol Clin Toxicol. №40(6). P. 789-801.
- Zhao M. Li G., Qiu F., Sun Y. 2016. Development and Validation of a Simple and Rapid UPLC-MS Assay for Valproic Acid and Its Comparison With Immunoassay and HPLC Methods // Ther Drug Monit. №38(2). P. 246-252.

## **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (HPLS-MS-MS) METHOD FOR DETECTION OF VALPROATE IN PLASMA**

**A.S. Malygin, N.S. Popov, M.A. Demidova, M.A. Gorshkova**

Tver State Medical University, Tver

We developed the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLS-MS-MS) method for detection of valproate in blood plasma. Chromatography was performed on a reversed-phase Phenomenex synergi Fusion column (2 mm × 50 mm, 4 μm). The mobile phase consisted of 0.1% ammonium acetate in distilled water and 0.1% ammonium acetate in methanol (10:90% v/v, 0.5 mL/min). The multiple ions monitoring (MIM) mode was used for mass spectrometric detection of valproic acid. MS of valproic acid was  $m/z$  143,1 in the negative ion mode. The quantitation limit of valproic acid in plasma

was 0,5 mkg/ml. The range of this method was from 1 mkg/ml to 200 mkg/ml. The method was validated by the parameters of selectivity, accuracy, precision, linearity, cross-transfer, stability.

**Keywords:** *HPLS-MS/MS, chromatography, mass-spectrometry, valproic acid, valproate, antiepileptic drugs.*

*Об авторах:*

МАЛЫГИН Александр Сергеевич – клинический ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, e-mail: shurik.malygin@mail.ru

ПОПОВ Никита Сергеевич – ассистент кафедры управления и экономики фармации, ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, e-mail: ns.popov@mail.ru

ДЕМИДОВА Марина Александровна – заведующая кафедрой управления и экономики фармации, д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, e-mail: demidova.m.a@mail.ru

ГОРШКОВА Марина Анатольевна – заведующая клинико-диагностической лабораторией поликлиники ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, e-mail: lab-f@yandex.ru

Малыгин А.С. Разработка и валидация методики ВЭЖХ-масс-спектрометрического определения вальпроатов в плазме крови / А.С. Малыгин, Н.С. Попов, М.А. Демидова, М.А. Горшкова // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2018. № 1. С. 47-57.